 doi 10.3969/j.issn.1673-4254.2016.11.18 J South Med Univ, 2016, 36(11): 1550-1554

技术方法

PCR毛细管电泳法检测嗜水气单胞菌gyrB和16SrRNA基因：溺死诊断方法

麦柏盛[1]，徐曲毅[1,2]，刘 超[2]，赵 建[2]，韩雅莉[1]
[1]广东工业大学轻工化工学院，广东 广州 510006；[2]广州市刑事科学技术研究所，公安部法医病理学重点实验室，广东 广州 510000

摘要：目的 建立嗜水气单胞菌gyrB和16SrRNA基因PCR毛细管电泳检测方法，探讨它们在淡水溺死诊断中的应用价值。**方法** 提取人、18种浮游生物（白色念珠菌、嗜水气单胞菌及16种藻类），以及经微波消解-真空抽滤-电镜扫描法检测过的30例尸体（其中生前淡水溺死28例，陆地自然死亡2例）的组织样本的DNA（肺、肝、肾各1份/例），分别使用引物AH（gyrB基因）及引物Ah（16SrRNA基因）进行扩增，扩增产物用毛细管电泳法检测。**结果** 人、白色念珠菌、16种藻类DNA扩增后毛细管电泳检测结果均为阴性，而嗜水气单胞菌结果均为阳性，其产物大小分别为195 bp，350 bp。分别利用引物AH和Ah对28例淡水溺死尸体样本肺、肝、肾进行PCR毛细管法进行检测，嗜水气单胞菌的检出率：AH分别为96.4%，71.4%，60.7%；Ah分别为75.0%，42.9%，32.1%，计算得到溺死者的体循环脏器中嗜水气单胞菌检验的总阳性率分别为82.1%，53.6%，2例陆地自然死亡案件尸体样本检测结果均为阴性。两对引物AH与Ah对嗜水气单胞菌检出率有显著性差异（P<0.05）。**结论** PCR毛细管电泳法检测嗜水气单胞菌gyrB基因用于诊断淡水溺死灵敏度较高，可作为诊断的辅助性方法；联用16SrRNA基因可提高该菌的检出率，增强MD-VF-Auto SEM法诊断淡水溺死的证据力。

关键词：法医病理学；溺死；嗜水气单胞菌；PCR毛细管电泳

Diagnosis of drowning by detecting gyrB and 16S rRNA genes of *Aeromonas hydrophila* using PCR-capillary electrophoresis

MAI Baisheng[1], XU Quyi[2], LIU Chao[2], ZHAO Jian[2], HAN Yali[1]
[1]College of Chemical Engineering and Light Industry, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006, China; [2]Guangzhou Forensic Science Institute /Key Laboratory of Forensic Pathology of Ministry of Public Security, Guangzhou 510000, China

Abstract: Objective To establish a method for diagnosis of freshwater drowning by amplifying gyrB and 16S rRNA genes of *Aeromonas hydrophila* using PCR coupled with capillary electrophoresis (CE). **Methods** DNA samples were extracted from human, 18 planktons (including Candida albicans, *Aeromonas hydrophila*, and 16 species of algae), and 30 cases of tissue samples (including the lung, liver, and kidney, all examined with microwave digestion-vacuum filtration-automated scanning electron microscopy) from human cadavers, including 28 freshwater drowning victims and 2 with natural death. The DNA samples were amplified with the primer AH (for gyrB gene) and primer Ah (for 16S rRNA gene), and the products were analyzed with CE. **Results** PCR amplification followed by CE yielded negative results for DNA of human, *Candida albicans* and 16 species of algae, whereas a positive result was found for *Aeromonas hydrophila* DNA with PCR products of 195 bp (with primer AH) and 350 bp (with primer Ah). In the 28 drowning cases, the detection rates of *Aeromonas hydrophila* using primer AH were 96.4% in the lung tissue, 71.4% in the liver tissue, and 60.7% in the kidney, as compared with the rates of 75.0%, 42.9%, and 32.1% using primer Ah, respectively. The positive rates for *Aeromonas hydrophila* in the organs of the drowning victims were 82.1% and 53.6% with primer AH and primer Ah, respectively. The detection showed negative results in the 2 cases of natural deaths. The two primers produced significantly different detection rates of *Aeromonas hydrophila* (P<0.05). **Conclusion** PCR coupled with CE for detecting gyrB gene of *Aeromonas hydrophila* has a high sensitivity in assisting a diagnosis of freshwater drowning. Detection of both the gyrB gene and 16S rRNA gene of *Aeromonas hydrophila* can yield more convincing evidence of the diagnosis of freshwater drowning.

Key words: forensic pathology; drowning; *Aeromonas hydrophila*; polymerase chain reaction; capillary electrophoresis

目前，法医学鉴定溺死的方法主要包括尸体剖检、硅藻检验以及浮游细菌检验等[1]。其中剖检尸体鉴定溺死主要依据一些溺死的典型特征进行判断，包括逝者口、鼻及呼吸道中出现白沫、肺肿大、胸膜积液以及胸膜下出血等，但是若尸体已高度腐败，上述特征则不明显甚至不存在，因而死因难以确定[1]。目前硅藻检验是诊断水中高度腐败尸体的金标准，但是，传统的硅藻检验

收稿日期：2016-06-11
基金项目：广东省公益研究和能力建设项目（2015A020217001）；公安部计划研究项目（2015JSYJA03）
作者简介：麦柏盛，硕士研究生，E-mail: maibaisheng03@163.com
通信作者：韩雅莉，博士，教授，博士生导师，E-mail: ylhan57@126.com

法存在操作过程危险、离心时造成硅藻损失和灵敏度低等不足[2]。微波消解-真空抽滤-电镜扫描法可以明显提高硅藻检验的特异性及硅藻检出率,该法有助于对硅藻进行定量和定性检测和推断溺死地点等[3]。但是,此法尚存在着操作者水平要求较高、设备昂贵及检验耗时较长等不足。因而,研发其他溺死相关浮游生物的检测方法,补强溺死的诊断鉴定手段,为准确快速判断淡水溺死提供辅助依据有重要意义。

随着分子生物学的发展,PCR检测浮游生物用于诊断溺死具有快速便捷、特异性强等优点,如徐曲毅[4]等提取硅藻DNA时使用磁性纳米粒子,提高PCR检出硅藻的阳性率,余政梁[5-6]等使用PCR技术检测溺亡实验兔组织器官中微藻的种类,一个工作日内便可得到检验结果。但是我国尚未开展使用嗜水气单胞菌诊断溺死的相关研究。嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)是一种体积小(0.2~2.0 μm)、主要分布于淡水水体的浮游生物,对于溺水者来说,在其入水过程中该菌会随溺液进入其呼吸系统,并随血液循环到达人体循环器官内[7]。本实验使用针对该菌gyrB基因和16SrRNA基因的两对特异性引物,采用PCR毛细管电泳检测分析,在对18种标准浮游生物提取DNA检验的基础上,以期建立淡水溺死受害者脏器样本中的嗜水气单胞菌分子生物学检验方法,为该菌作为淡水溺死鉴定的辅助指标奠定实验基础;同时,有助于提高确定水中尸体死因时效性,在案件侦破中有较好的应用前景。

1 材料和方法

1.1 仪器与试剂

VeritiTM96孔热循环仪(美国AB),3130毛细管电泳仪(美国AB),恒温混匀仪(珠海博迈杰生物科技有限公司),涡旋振荡器(美国SI),台式离心机(德国Sigma)。

PowerSoil™ DNA Isolation Kit试剂盒购自深圳安必胜公司,20 mg/mL蛋白酶K(Qiagen公司),Premix Taq酶(Takara公司),甲酰胺(美国AB),CC5ILS500(美国AB)。

1.2 样本收集

1.2.1 衣藻(*Chlamydomonas*)、土壤藻(*Soil algae*)、四列藻(*Tetraselmistetrathele*)、假鱼腥藻(P*seudanabaena sp*)、骨条藻(*Skeletonema*)、脆杆藻(*Fragilaria sp*)、满江红鱼腥藻(*Anabaena azollae*)、扁藻(*Tetraselmis*)、舟行藻(*Navicula sp*)、小环藻(*Cyclotella sp*)、菱形藻(*Nitzschia sp*)、针杆藻(*Synedra radians*)、直链藻(*Melosira varians*)、硅鞭金藻(Chlorella)等的标准藻株均购自中国科学院水生生物研究所;微囊藻(*Microcystis*)、小球藻(*Distephanus*)的标准藻株购自暨南大学赤潮与水生生物学研究中心;白色念珠菌(*Candida albicans*)和嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)的标准菌株购自广东省微生物研究所。

1.2.2 30份尸体组织样本(肺、肝、肾)及样本的MD-VF-Auto SEM法检验结果由广州市刑事科学技术研究所提供,其中淡水溺死尸体28例,陆地自然死亡尸体2例。分别取各样本肺、肝、肾组织0.5 g作为PCR法检验样本。包括肺在内,按至少在尸体的肝或肾任一组织中检出嗜水气单胞菌,计算嗜水气单胞菌检验的总阳性率(%)。

1.3 藻类、细菌及尸体样本DNA提取

参照文献[8]的方法,将含有藻类与细菌标准株液体各0.5 mL分别加入PowerBead管中;将各组织样本0.5 g剪碎加入PowerBead管中,加入10 μL蛋白酶k(20 mg/mL),置恒温混匀仪56 ℃,2 h后,静置于−20 ℃ 10 min,和98 ℃,10 min。使用PowerSoil™ DNA Isolation Kit试剂盒提取各组织中嗜水气单胞菌及18种浮游生物标准株的DNA。

1.4 PCR扩增

使用Suto[9]和饶静静[10]分别报道的引物AH和Ah,扩增嗜水气单胞菌的gyrB基因和16SrRNA基因,两对引物对序列如下:AHF:5'-GAACGACGCCTATCAGGAAG-3'; AHR:5'-ACGGAGATAACGGCAATCAG-3'。AhF:5'-GGGAGTGCCTTCGGGAATCAGA-3'; AhR:5'-TCACCGCAACATTCTGATTTG-3'。正向引物5'端均以FAM荧光标记,引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。PCR扩增总体系为20 μL,内含10 μL Premix Taq酶,上下游引物各0.75 μL(10 μmol/L),7.5 μL去离子水,1 μL模板DNA。PCR热循环参数分别为:94 ℃ 10 min;94 ℃ 40 s,61 ℃ 30 s,72 ℃ 40 s,共35个循环;最后72 ℃,延伸10 min; 94 ℃ 10 min;94 ℃ 40 s,63 ℃ 30 s,72 ℃ 40 s,共35个循环;最后72 ℃,延伸10 min。

1.5 特异性试验

两对引物分别对18种标准株和人基因组DNA进行PCR扩增,包括衣藻、土壤藻、四列藻、假鱼腥藻、骨条藻、脆杆藻、满江红鱼腥藻、扁藻、舟行藻、小环藻、菱形藻、针杆藻、直链藻、硅鞭金藻、微囊藻、小球藻、白色念珠菌、嗜水气单胞菌、人基因(女)、人基因(男)。

1.6 毛细管电泳检测

PCR扩增后的产物使用毛细管电泳技术检测分析。9 μL甲酰胺,1 μL ILSCC500内标,1 μL PCR产物混合后作为毛细管电泳上样样本。

1.7 产物测序

随机选取引物AH和Ah检测阳性的体循环脏器样本各1份,委托上海生工生物工程技术服务有限公司进行测序,测序结果与NCBI数据库(http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)比对分析。

1.8 统计学分析

采用SPSS22.0统计软件进行统计分析。引物AH和引物Ah两种检验方法的比较使用独立*T*检验，$P<0.05$为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 引物的特异性验证

使用AH及Ah两对引物分别扩增16种藻类、人、白色念珠菌及嗜水气单胞菌DNA，并将PCR产物进行毛细管电泳检测。结果表明，仅以嗜水气单胞菌标准株（*Aeromonas hydrophila*）基因组DNA为模板，上述2对引物扩增得到了相对分子质量为195 bp的gyrB基因及350 bp的16SrRNA基因，该结果与预期结果相符；而人、16种藻类以及白色念珠菌的DNA扩增后，未检出阳性片段，表明两对引物均具有良好的物种特异性。

2.2 PCR毛细管电泳法与MD-VF-Auto SEM法检测30份尸体组织样本的结果

30例案件尸体的组织样本提取DNA后，使用引物AH及Ah进行PCR扩增和毛细管电泳检测，同时比较MD-VF-Auto SEM法的检验结果，其中体循环脏器的检验结果见表1。MD-VF-Auto SEM法结果表明：案件1和16的死者为陆地自然死亡，其肺、肝、肾中硅藻检测结果均为阴性；其余28例案件死者为淡水溺死，经对脏器样本的硅藻检测，结果均为阳性，计算得到溺死者脏器硅藻检验的总阳性率为100%。

表1 PCR毛细管电泳法检测尸体体循环脏器样本中的嗜水气单胞菌与MD-VF-Auto SEM法检测体循环脏器样本中的藻类检测结果

Tab.1 Results of PCR CE for detecting *Aeromonas hydrophila* and MD-VF-Auto SEM for detecting algae in the lungs, liver and kidneys of the 30 cadavers

Case Number	Result			Case Number	Result		
	SEM	AH	Ah		SEM	AH	Ah
1	N(0)	N	N	16	N(0)	N	N
2	D(4)	D	N	17	D(6)	D	D
3	D(12)	D	N	18	D(70)	D	N
4	D(16)	N	D	19	D(7)	N	N
5	D(1)	D	D	20	D(9)	D	N
6	D(63)	D	N	21	D(20)	D	D
7	D(6)	D	D	22	D(6)	N	N
8	D(7)	D	D	23	D(43)	D	D
9	D(5)	D	D	24	D(17)	D	N
10	D(3)	D	D	25	D(49)	D	D
11	D(15)	N	N	26	D(3)	D	N
12	D(6)	D	D	27	D(5)	N	N
13	D(2)	D	D	28	D(3)	D	N
14	D(37)	D	D	29	D(1)	D	D
15	D(7)	D	N	30	D(8)	D	D

D: Detected; N: Not detected; Figure in brackets means the number of diatom in body viscera.

PCR毛细管电泳法检验结果表明：案件1和16死者样本检验均为阴性，而其余28例淡水溺死尸体的肺、肝、肾脏器样本，引物AH进行PCR检测后，嗜水气单胞菌检出率分别为96.4%，71.4%，60.7%；引物Ah进行PCR检测，嗜水气单胞菌的检出率分别为75.0%，42.9%，32.1%，计算得到溺死者体循环脏器中嗜水气

单胞菌检验的总阳性率分别为82.1%,53.6%。在溺死尸体体循环脏器中,引物AH对嗜水气单胞菌的检出率均高于引物Ah的检出率。两对引物检验溺死尸体各种脏器中嗜水气单胞菌阳性率之间具有统计学差异(P<0.05)。

2.3 产物测序比对结果

引物AH和Ah对体循环脏器样本DNA进行扩增,分别得到195 bp,350 bp的扩增片段,与嗜水气单胞菌标准株gyrB基因,16SrRNA基因的扩增条带一致。

PCR产物序列如下(AH):

GCAGACTTGGCCTTCTTGCTGTAGTCCTCTTTGTCCATGTAGGAGTTGAGGGTACGGGTCAGCGCGGTACGGAAGCCCACCAGGTGGGTGCCGCCATCACGCTGCGGAATGTTGTTGGTGAAGCAGTA-CACCCCTTC

PCR产物序列如下(Ah):GTCGAGTTGCAGACTCCGATCCGGACTACGACGCGCTTTTTGGGATTCGCTCACTATCGCTAGTTTGCAGCCCTCTGTACGCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTATCACCGGCAGTCTCCCTTGAGTTCCCACCATTACGTGCTGGCAACAAAGGACAGGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAG-CACCTGTGTTCTGATTCCCGAGGGCACTCCCA。

经引物AH扩增的PCR产物测序序列比对结果与GenBank中提交的JX275847、DQ519366、AY987520等gyrB基因序列的同源性为96%~99%之间,说明其为嗜水气单胞菌gyrB的特异性条带;经引物Ah扩增的PCR产物测序序列比对结果与GenBank中提交的EF077527、DQ207728、DQ990053等16SrRNA基因序列的同源性均在99%以上,说明其为嗜水气单胞菌16SrRNA的特异性条带。

3 讨论

3.1 嗜水气单胞菌16SrRNA基因和gyrB基因在溺死中的利用价值

本文检测的两个靶基因为16 SrRNA基因和促旋酶(gyrase)B亚单位基因(gyrB),是基于它们均具有不同物种的高度保守性,目前已被作为不同物种亲缘关系与进化关系的判定依据[11]。16SrRNA基因几乎可以对所有的细菌进行属以上的鉴定,是作为细菌系统发育分类的主要标志之一[12]。编码促旋酶的gyrB基因,能满足细菌系统发育分类的要求[13],如Yanez等[14]分析了53株气单胞菌的gyrB基因序列,结果表明,该基因序列可辨别气单胞菌属,其种间相似率为86.7%~100%,而且该基因序列可区分气单胞菌(*Aeromonas sp.*)、霍乱弧菌(*V.cholerae*)、大肠杆菌(*E.coli.*)以及志贺假单胞菌(*Plesiomonas shigelloedes*)。由此可见,gyrB基因分析适用于细菌分类和近缘种鉴定。基于上述原因,本文选用2个相对保守的基因作为检测的靶分子,才有望建立准确而有效的检测死者有关脏器中嗜水气单胞菌的方法。

3.2 两对引物在溺死鉴定中的应用价值

本文所使用的AH及Ah两对引物对各样品进行PCR扩增,结果仅嗜水气单胞菌DNA得到扩增产物,分别得到195 bp,350 bp的片段,这一结果与文献报道[9, 10]的产物大小一致,同时上述引物对人、藻类、白色念珠菌DNA进行扩增,结果均为阴性,这表明本文所使用的两对引物均具有高度特异性。

本项研究中的案件1和16死者均为陆地自然死亡,两死者的组织样本经引物AH及Ah扩增和毛细管电泳检验分析,结果均为阴性,与实际案情相符。而用两对引物对其余28例溺死尸体样本(肺、肝、肾)中的嗜水气单胞菌的检出率分别是,AH:96.4%,71.4%,60.7%;Ah:75.0%,42.9%,32.1%,计算得到溺死者脏器中嗜水气单胞菌检验的总阳性率分别为82.1%,53.6%。结果显示引物AH的检出率及阳性率均高于引物Ah,两对引物检验溺死尸体各种脏器及水样中嗜水气单胞菌阳性率之间具有显著性差异(P<0.05)。经软件Oligo7.0分析,原因在于引物AH的综合评价比Ah更好,AH检出该菌的能力比Ah更具优势。

案例4死者体循环脏器检验该剧结果显示,引物AH检验阴性,而Ah检验阳性,统计两对引物检验的总阳性率达85.7%,与Uchiyama等[15]检验淡水溺亡者体循环器官中气单胞菌的总阳性率84.0%相比,检验情况一致。这表明两对引物联合使用诊断溺死,可提高该菌在淡水溺亡者中的检出率。

在三种脏器中,该菌在肺部检出率较肝脏和肾脏的检出率高,缘于浮游生物因水的压力作用较易渗入尸体肺部,所以,如仅依据肺部阳性结果是不能判断溺死[16],必须综合其他体循环脏器的检测情况作出判断。鉴于嗜水气单胞菌主要在淡水中生存,建立的检测方法主要适用于淡水溺亡者,不适用于海水或浴室溺亡者和非溺亡者[17]。所以,在判断刑事案件中水中尸体死因时,需综合分析尸体体循环脏器嗜水气单胞菌的检出结果,方可推断其是否为生前入水(即溺水而亡)。

3.3 PCR毛细管电泳法与MD-VF-Auto SEM法的比较

MD-VF-Auto SEM法是目前硅藻检验中一种较为可靠的方法[3],检验结果表明:案件1和16的陆地自然死亡的死者肺、肝、肾中硅藻检测结果均为阴性;其余28例案件的淡水溺亡者脏器样本的检测结果均为阳性,溺死者脏器硅藻检验的总阳性率为100%。虽然 该法定

性定量分析准确,但是对组织取材量较大,肺组织需要2 g,肝/肾组织均需要10 g,且该法的设备昂贵,从取材至得到检验结果需要2 d,且每次只能检验1个案件中的样本(肺、肝、肾),对操作者水平要求较高。而PCR法具有耗材量少(每个组织样本仅需0.5 g),操作简便,耗时短(<1 d)以及可以同时进行多个样品(最多96个)测定等优点。

MD-VF-Auto SEM法检测案例5,10,13和29的尸体肝脏硅藻数(表1),分别为1、3、2、1个,检出硅藻数量少,不能完全诊断为溺死[18-19],当检验硅藻样本数量较多时(≥4个/10 g),才能充分证明受害者为生前入水[20]。而PCR-CE法检测嗜水气单胞菌gyrB基因验证上述案例的脏器时,结果均显示阳性。因此,当MD-VF-Auto SEM法不能确定溺死,或溺死尸体样本中检出的硅藻数量较少时(≤3个/10 g),采用PCR-CE法对嗜水气单胞菌gyrB基因进行检测,可以为判断淡水溺死提供辅助性依据。

案例11、19、22和27死者的体循环脏器两引物检验结果均为阴性,是由于在溺水地点该菌的浓度低或溺水地点水温过低所致,这两种情况均可导致进入溺死受害者肝脏、肾脏中的嗜水气单胞菌过少,以致采用PCR-CE法不能检验该菌在体循环脏器中的存在情况。虽然本研究所使用的方法诊断溺死较MD-VF-Auto SEM法的检出率稍低,但是本方法非常适于建立高通量检测,检验过程耗时短,所需设备是法医物证实验室通用设备,技术操作简便,因而,基于此方法提供淡水溺死鉴定的辅助指标对浮游细菌诊断溺死具有重要法医学意义。

本文建立的PCR-CE法检测嗜水气单胞菌gyrB基因,灵敏度较高,所用时间短,操作简单,可作为淡水溺死诊断的辅助性方法,对溺死样本的快速筛选和决定进一步深化检验有较好前景;联用16SrRNA基因可提高该菌在溺亡者中的检出率,增强MD-VF-Auto SEM法检验淡水溺死诊断的证据力。

参考文献:

[1] Yukawa N, Kakizaki E, Kozawa S. Diatom and laboratory tests to support a conclusion of death by drowning//Essentials of Autopsy Practice[M]. London: Springer, 2013: 1-36.

[2] Xu Q, Liu C, Zhao J, et al. Comparison of digestion methods complied with two nanofiltration membranes on the efficiency of diatoms recovery[J]. J Nanosci Nanotechnol, 2016, 16(7): 7129-33.

[3] Zhao J, Liu C, Hu SL, et al. Microwave Digestion-Vacuum Filtration-Automated scanning electron microscopy as a sensitive method for forensic diatom test[J]. Int J Legal Med, 2013, 127(2): 459-63.

[4] Xu QY, Yu ZL, Mai BS, et al. Magnetic nanoparticles enhanced DNA extraction and detection of forensic algae by multiplex PCR capillary electrophoresis[J]. Nanosci Nanotechnol Letters, 2016, 8 (8): 682-7.

[5] Yu Z, Liu C, Hu S, et al. PCR-Capillary electrophoresis is a new method for forensic diatom testing[J]. J Pure Applied Microbiol, 2014, 8(2): 1467-74.

[6] Yu ZL, Liu C, Wang HJ, et al. The effect of enzyme digestion time on the detection of diatom species[J]. Pak J Pharm Sci, 2014, 27(3, S): 691-4.

[7] Kakizaki E, Takahama K, Seo Y, et al. Marine bacteria comprise a possible indicator of drowning in seawater[J]. Forensic Sci Int, 2008, 176(2/3): 236-47.

[8] 李 鹏, 徐曲毅, 陈 玲, 等. 检测藻类16SrDNA特异性片段在溺死诊断中的应用[J]. 南方医科大学学报, 2015, 35(8): 1215-8.

[9] Suto M, Kato N, Abe S, et al. PCR detection of bacterial genes provides evidence of death by drowning[J]. Leg Med (Tokyo), 2009, 11(Suppl 1): S354-6.

[10] 饶静静, 李寿崧, 黄克和, 等. 致病性嗜水气单胞菌多重PCR检测方法的建立[J]. 中国水产科学, 2007, 14(5): 749-55.

[11] 侯晓丽, 陈 智. 分类及鉴别细菌的新靶标--gyrB基因[J]. 国外医学: 流行病学传染病学分册, 2005, 32(1): 38-41.

[12] 刘 驰, 李家宝, 芮俊鹏, 等. 16S rRNA基因在微生物生态学中的应用[J]. 生态学报, 2015, 35(9): 2769-88.

[13] Izumi S, Yamamoto M, Suzuki K, et al. Identification and detection of Pseudomonas plecoglossicida isolates with PCR primers targeting the gyrB region[J]. J Fish Dis, 2007, 30(7): 391-7.

[14] Yanez MA, Catalan V, Apraiz D, et al. Phylogenetic analysis of members of the genus Aeromonas based on gyrB gene sequences [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2003, 53(3): 875-83.

[15] Uchiyama T, Kakizaki E, Kozawa S, et al. A new molecular approach to help conclude drowning as a cause of death: Simultaneous detection of eight bacterioplankton species using real-time PCR assays with TaqMan probes[J]. Forensic Sci Int, 2012, 222(1/3): 11-26.

[16] He FG, Huang DX, Liu L, et al. A novel PCR-DGGE-based method for identifying plankton 16S rDNA for the diagnosis of drowning [J]. Forensic Sci Int, 2008, 176(2/3): 152-6.

[17] Rutty GN, Bradley CJ, Biggs MJ, et al. Detection of bacterio-plankton using PCR probes as a diagnostic indicator for drowning; the Leicester experience[J]. Leg Med, 2015, 17(5): 401-8.

[18] Ludes B, Quantin S, Coste M, et al. Application of a simple enzymatic digestion method for diatom detection in the diagnosis of drowning in putrified corpses by diatom analysis[J]. Int J Legal Med, 1994, 107(1): 37-41.

[19] Ludes B, Coste M, Tracqui A, et al. Continuous river monitoring of the diatoms in the diagnosis of drowning[J]. J Forensic Sci, 1996, 41(3): 425-8.

[20] 赵 建, 袁自闯, 张彦吉, 等. 两种硅藻检验方法的比较[J]. 中国法医学杂志, 2015, 30(1): 62-5.

(编辑:吴锦雅)